

# 早老症Werner症候群原因遺伝子産物WRNと相互作用 するタンパク質Wemer helicase interacting protein 1 (WRNIP1)の機能の解析

著者	吉村 明
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬第530号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/51109">http://hdl.handle.net/10097/51109</a>

氏 名（本籍） よし むら あかり  
吉 村 明

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬博第530号

学位授与年月日                      平成 21 年 9 月 4 日

学位授与の要件                      学位規則第4条第1項該当

## 學位論文題目

# 早老症 Werner 症候群原因遺伝子産物 WRN と相互作用するタンパク質 Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) の機能の解析

論文審查委員	(主查)	教授	榎本武美
		教授	平澤典保
		教授	中畑則道

# 論文内容要旨

## 目的

本研究では、早老症 Werner 症候群原因遺伝子産物 WRN と相互作用するタンパク質として当研究室で見出された Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) の機能解析を目的とした。特に、損傷トレランス機構で働く Rad18 と WRNIP1 の機能的連携の解明を目指した。

## 背景

DNA は絶えず種々の損傷を受けているが、生物はそれを修復する様々な機構を備えている。DNA 複製の進行が DNA 損傷により阻害され、複製が再開できないと細胞は死に至る。このような DNA 複製における異常事態を回避するために、細胞には「損傷トレランス機構」が存在することが近年の研究により明らかになってきた。

出芽酵母を用いた遺伝学的解析から、損傷トレランス機構のうち、損傷乗り越え合成と鋳型鎖乗り換えの二つの経路が、Rad6-Rad18 複合体により制御され、鋳型鎖乗り換えには更に Ubc13-Mms2-Rad5 が関与することが示唆されている。DNA 損傷が生じると Rad6-Rad18 により、DNA 複製で重要な役割を担う PCNA がモノユビキチン化される。ユビキチン化された PCNA を足場として、複製 DNA ポリメラーゼから、損傷 DNA 上でも DNA 合成できる損傷乗り越え DNA ポリメラーゼへの切り替えが起こることにより損傷を乗り越え、その後再び複製ポリメラーゼへの再切り替えにより複製が進行するというモデルが現在提唱されている。この損傷乗り越えでは複製の停止を回避できない場合、第二の経路として機能するのが、Ubc13-Mms2-Rad5 からなる経路である。Rad6-Rad18 によりモノユビキチン化された PCNA を、さらに Ubc13-Mms2-Rad5 複合体がポリユビキチン化する。PCNA がポリユビキチン化されると、DNA 複製装置が親鎖（鋳型鎖）からはずれ、損傷部位と同じ配列をもつ娘鎖（新生鎖）へ乗り換える、鋳型鎖乗り換え経路が働くようになる。このような損傷トレランス機構は酵母からヒトに至るまで保存されている。

WRNIP1 の出芽酵母ホモログ MGS1 と DNA 損傷トレランス機構に必須な RAD6, RAD18 あるいは RAD5 遺伝子との二重変異により合成致死や、顕著な増殖阻害が引き起こされることから、DNA の損傷により複製の進行が停止したような特殊な状況下で Mgs1 の機能が必要とされと考えられる。一方、WRNIP1 は、DNA 複製酵素である Pol $\delta$  に結合し、テンプレートプライマーに Pol $\delta$  をリクルートすることにより Pol $\delta$  の活性を促進するという結果も得られている。このような状況証拠から、WRNIP1 が Pol $\delta$  の活性を制御することで損傷トレランス機構に関与しているのではないかと考えられた。

## 結果と考察

### 1) RAD18 遺伝子破壊株 (rad18 細胞) のカンプトテシン高感受性に関する解析

高等真核細胞のなかで特に遺伝子破壊が容易なニワトリ B リンパ球由来の DT40 細胞を用いて、

*WRNIP1* と *RAD18* の遺伝学的相互作用について調べるために、まず始めに *rad18* 細胞の性状解析を行った。DNA 複製依存的に DNA 二本鎖切断を生成することが知られているカンプトテシン (Camptothecin; CPT) に対する感受性を調べたところ、*rad18* 細胞は CPT に極めて高い感受性を示した。Rad18 が支配する DNA 損傷トレランス機構のうち、損傷乗り越え経路に関わる損傷乗り越えポリメラーゼ Polη, Polκ 等の欠損 DT40 細胞は CPT 感受性は示さなかったことから、Rad18 が CPT によって引き起こされる DNA 損傷に対して、損傷乗り越え経路以外の経路を介して DNA 損傷に由来する障害の処理を行っていることが示唆された。

## 2) *WRNIP1*, *RAD18* 二重変異株 (*wrnip1 rad18* 細胞) の解析

*WRNIP1* と *RAD18* の機能的関連を遺伝学的に調べるために、*WRNIP1* と *RAD18* 遺伝子の二重破壊株を DT40 細胞を用いて作製した。出芽酵母を用いた遺伝学的解析では、*RAD18* と *MGS1* 遺伝子の二重変異は合成致死性を示したが、予想外に、DT40 細胞では出芽酵母の場合と異なり *wrnip1 rad18* 細胞は生存可能であった。さらに *wrnip1 rad18* 細胞の CPT に対する感受性は *rad18* 細胞より若干軽減していた。つまり、*WRNIP1* の欠損により *rad18* 細胞の CPT 高感受性が若干抑制されたことから、CPT による DNA 障害の処理という特殊な状況下では、部分的に *WRNIP1* が Rad18 の上流で機能することが示唆された。また、CPT 処理をした際の姉妹染色分体交換頻度の解析結果から、CPT による障害を処理する際には、Rad18 は相同組換えの経路で機能していることが示唆された。

## 3) *WRNIP1* と *RAD18* の物理的、機能的相互作用に関する解析

高等動物細胞において *WRNIP1* と Rad18 との間に遺伝学的な関係があることから、*WRNIP1* と Rad18 が、直接あるいは間接的な相互作用をする可能性が示唆された。そこで、両者の物理的相互作用の有無の検討を行い、さらに、精製した *WRNIP1* とヒト *RAD18* を用いて生化学的解析を行うことにより、両者の機能的関係について検討した。

その結果、*WRNIP1* と *RAD18* が実際に物理的に相互作用することが明らかになった。*WRNIP1* と *WRN* との相互作用には ATP が必要であるが、*RAD18* と *WRNIP1* との相互作用には ATP は必要ではなかった。

また、*WRNIP1* は全長にわたって replication factor C (RFC) と相同性を持つ。この RFC には DNA 結合活性があり、DNA との結合によって RFC の ATPase 活性が活性化されてその機能が発揮される。*WRNIP1* も RFC と同様に DNA に結合して機能するのではないかと考え、*WRNIP1* の DNA 結合能をゲルシフト分析法により調べた。その結果、*WRNIP1* が ATP 依存的に DNA に結合することが判明し、*WRNIP1* が、RFC のように、ATP と結合して DNA に結合し、自身の持つ AAA+ ATPase 活性によって DNA 上で自身の構造を変化させているのではないかと考えられた。*WRNIP1* は 120 mer の一本鎖 DNA、テンプレートプライマー型の DNA や停止した複製フォークに似たギャップがあるフォーク型 DNA に結合したが、その中でもフォーク型 DNA に特によく結合した。また、*WRNIP1* と *RAD18-RAD6B* の両者が共存すると、*RAD18* が結合している DNA に *WRNIP1* がリクルートされること、一方、*RAD18-RAD6B* の DNA 結合は *WRNIP1* に取って代わられるため、*WRNIP1* が *RAD18-RAD6B* の DNA 結合を阻

害することが判明した。以上の結果から、WRNIP1 が損傷トレランス機構の中心で働く RAD18 と連携をとりながら、損傷トレランス機構に関与することが示唆された。

本研究により、細胞に CPT を処理した時に生じる DNA 障害を処理する場合のような特殊な状況下では、Rad18 が損傷トレランス機構ではなく相同組換えの経路で働き、その上流で WRNIP1 が機能することが示唆された。酵母の *RAD18* 欠損株は CPT に感受性ではなく、酵母の Rad18 がこのような経路で働くという報告はないことから、CPT を処理した時に明らかになった Rad18 の機能は高等真核細胞に特有の機能である可能性がある。

また、出芽酵母を用いた遺伝学的解析から、Mgs1 が Rad18 と同一ではないが同様の鋳型鎖乗り換え機構で機能することが示唆されていたが、WRNIP1 と RAD18 の DNA 結合に関する生化学的解析から、WRNIP1 と RAD18 が機能的に連携しながら損傷トレランス機構へ関与することが、本研究において示唆された。即ち、WRNIP1 が損傷乗り越え機構に関わり、RAD18 が WRNIP1 をリクルートし、WRNIP1 が Pol  $\delta$  をリクルートすることによりポリメラーゼスイッチの制御に関与する可能性であり、また、鋳型鎖乗り換えが必要な場合には、まず初めに WRNIP1 が関与する経路を選択し、WRNIP1 が欠損した時に RAD18 が関与する可能性である。このように、DNA 複製や修復における様々な局面に応じて、Rad18 と WRNIP1 はお互いに連携をとりながら、部分的に協調する、お互いの機能を制御するなど、相互の関係を変えながら機能していると考えられる。本研究が今後の WRNIP1 が関わる損傷トレランス機構の解明への端緒となることが期待される。

## 審査結果の要旨

Werner 症候群 (WS) は早老症の代表的疾患で、若年期より、糖尿病、動脈硬化、骨粗鬆症など老化に関連した種々の症状を発症する。この Werner 症候群原因遺伝子産物 WRN と相互作用するタンパク質として Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) が我々の研究室で発見された。酵母を用いた遺伝学的解析から、WRNIP1 は損傷トレランス機構で働く Rad18 と類似した機能をもつことが示唆されている。本研究は、高等真核細胞の WRNIP1 の機能を明らかにすることを目的とし、特に、損傷トレランス機構で働く Rad18 と WRNIP1 の機能的連携の解明を目指したものである。

まずはじめに、遺伝子破壊が容易なニトリ B リンパ球由来の DT40 細胞を用いて *WRNIP1* と *RAD18* の機能的関連を遺伝学的に調べるために、*RAD18* 遺伝子破壊株 (*rad18* 細胞) の性状解析を行った。DNA 複製依存的に DNA 二本鎖切断を生成することが知られているカンプトテシン (CPT) に対する感受性を調べたところ、*rad18* 細胞は CPT に極めて高い感受性を示した。この感受性の原因を調べることで、Rad18 が今まで全く知られていなかった修復経路で機能することが明らかになった。

次に、*WRNIP1* と *RAD18* 遺伝子の二重破壊株 (*wrnip1 rad18* 細胞) を作製して解析を行った。出芽酵母を用いた遺伝学的解析から、*RAD18* と *MGS1* (酵母の *WRNIP1* 相同遺伝子) の二重変異は致死になる可能性があったが、予想に反し *wrnip1 rad18* 細胞は生存可能であった。さらに *wrnip1 rad18* 細胞の CPT に対する感受性は *rad18* 細胞より若干軽減していた。この結果から、CPT による DNA 障害の処理という特殊な状況下で、WRNIP1 は部分的に Rad18 と同一経路で機能することが示唆された。

以上の解析から、WRNIP1 と Rad18 との間に機能的関連があることが判明したことから、WRNIP1 と Rad18 の両者の物理的相互作用の有無を検討した。WRNIP1 を過剰発現した細胞の抽出液から免疫沈降することで、両者の結合を確認するとともに、精製したヒト WRNIP1 とヒト RAD18 を用いて生化学的解析を行うことにより、両者の結合を確認した。

また、DNA への結合における両者の関係を調べ、WRNIP1 と RAD18 の両者が共存すると、RAD18 が結合している DNA に WRNIP1 がリクルートされ、WRNIP1 が RAD18 と置き代わることを明らかにした。以上の結果から、DNA 複製や修復における様々な局面に応じて、WRNIP1 と Rad18 とはお互いに連携をとりながら、部分的に協調する、お互いの機能を制御するなど、相互の関係を変えながら機能していることが示唆された。

このように、本研究は WRNIP1 の機能の解明につながる重要な成果を挙げ、損傷トレランス機構の研究の進展に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。